

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Mestrado Integrado em Medicina

Trabalho Final de Mestrado



ASCA na Doença de Crohn: Um enfoque na etiopatogénese

Lisboa, Abril de 2016

**Clínica Universitária de Gastroenterologia
Faculdade de Medicina de Lisboa – Hospital de Santa Maria**

Orientador: Prof. Doutor Luís Carrilho Ribeiro

Discente: 12842 Ricardo Manuel Martins Delgado

Índice

ÍNDICE	1
LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	2
I. INTRODUÇÃO	3
I. ESTADO DA ARTE DO CONHECIMENTO SOBRE DC	3
II. PADRÕES FENOTÍPICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA DII	3
II. FUNDAMENTOS DA ETIOPATOGENESE DA DC	5
I. ETIOPATOGENESE DA DC E MICROBIOMA	5
II. CONSIDERAÇÕES GENÉTICAS NA DC	6
III. REGULAÇÃO IMUNE DEFICIENTE NA DC	7
IV. EPIDEMIOLOGIA	8
V. MODELO INTEGRADO DE KASER PARA O DESENVOLVIMENTO DA DII	9
III. OS ASCA NA DC – ESTADO DA ARTE	10
I. ANTICORPOS ANTI-<i>SACCHAROMYCES CEREVISAE</i>	10
II. O ESTUDO SEROLÓGICO NA DC	10
III. NOVOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ASCA	10
IV. VALOR PROGNÓSTICO	11
IV. ASCA – VALOR NA ETIOPATOGENESE EM GRUPOS ESPECÍFICOS	12
I. ETIOPATOGENIA	12
II. UM ESTUDO PROSPECTIVO EM ISRAEL ^[26]	13
V. DISCUSSÃO E INTEGRAÇÃO COM O ESTADO DE ARTE	16
VI. AGRADECIMENTOS	17
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
VIII. APÊNDICE	20



LISTA DE ABREVIATURAS

ASCA: Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*; **CEI:** Células epiteliais intestinais; **DC:** Doença de Crohn; **DII:** Doença inflamatória intestinal; **GI:** gastrointestinal; **pANCA:** Anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares; **p.ex.:** por exemplo; **RCU:** Recto-colite ulcerosa; **RE:** Retículo endotelial; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença inflamatória crónica idiopática, em cuja patogénese está envolvida uma desregulação da resposta imune ao microbioma intestinal.

Apesar de avanços significativos na terapêutica, resultantes do esclarecimento de aspectos fisiopatológicos alicerçados em estudos genéticos, a etiologia da doença permanece desconhecida. A presença do *Saccharomyces cerevisiae* (SC) na etiopatogénese da Doença de Crohn (DC) tem sido sugerida em diversos estudos, devido à presença de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA).

Na presente dissertação é analisada a melhor evidência disponível no que concerne a tal tese.

Um estudo prospetivo conduzido na população israelita verificou a presença de ASCA antes do diagnóstico de DC em 31.3% dos doentes e em 0.0% dos controlos, apresentando um intervalo médio entre a deteção de ASCA e o diagnóstico de DC de 38 meses.

A conclusão é a de que embora a maioria dos estudos verifique uma relação de associação entre a presença de ASCA e DC, em que a deteção dos mesmos assume um valor prognóstico, não é possível provar uma relação de causalidade definitiva. Para tal, seriam necessários estudos longitudinais prospetivos de maior dimensão, cuja realização é ansiosamente aguardada.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease is an inflammatory chronic idiopathic entity, in which a deregulation of the immune response to the enteric microbiome is suggested.

Despite significant improvements in therapeutics, resulting from the clarification of physiopathological aspects grounded on genetic studies, the etiology of the disease remains to be discovered. The role of *Saccharomyces cerevisiae* in the etiopathogenesis of Crohn's Disease has been implied in several studies, due to the presence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies.

In the present dissertation we analyse the best evidence available regarding such thesis.

A prospective study conducted in the Israeli population verified the presence of ASCA before diagnosis in 31.3% of patients with CD, but only 0.0% of healthy controls, with a mean interval between detection of ASCA and CD diagnosis of 38 months.

The conclusion is that even though the majority of studies shows a relationship of association between the presence of ASCA and DC, in which the detection of such antibodies has a prognostic value, it is not possible to prove a definite relationship of causality. In order to achieve it, longitudinal prospective studies would be needed, whose realization is solicitously awaited.

I. INTRODUÇÃO

I. Estado da arte do conhecimento sobre DC

Classicamente concebida como entidade originadora de uma expressão clínica dicotómica, a doença inflamatória intestinal (DII) assume-se detentora de uma complexidade histopatológica significativa e condicionadora de elevada morbilidade física e psíquica nos substratos da população acometida ^[1, 2].

Apesar dos avanços significativos no campo da terapêutica, a etiologia da doença permanece desconhecida. O papel do *Saccharomyces cerevisiae* (SC) na etiopatogénese da Doença de Crohn (DC) tem sido sugerido em diversos estudos, mediante a produção de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ^[3].

A presente dissertação foca-se na análise destes trabalhos, com o objectivo de apresentar a melhor evidência actualmente disponível que serve de suporte a tal tese. Secundariamente, são apresentados estudos relativos ao estado da arte acerca da relevância do microbioma no desenvolvimento da DC.

II. Padrões fenotípicos e histopatológicos da DII

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença inflamatória crónica idiopática, em cuja patogénese está envolvida uma desregulação da resposta imune ao microbioma intestinal ^[4, 5, 6].

Historicamente, descrevem-se dois padrões fenotípicos principais na DII: a DC e a recto-colite ulcerosa (RCU), aos quais se associam características histopatológicas específicas, justificando uma abordagem individualizada na monitorização da actividade da doença e a adopção de esquemas de terapêuticos dirigidos.

BREVE CARACTERIZAÇÃO DA DC:

Localização: A DC pode afectar qualquer parte do tubo digestivo, desde a boca até ao ânus. Cerca de 30-40% dos doentes tem acometimento exclusivo do intestino delgado, 40-55% tem acometimento do intestino delgado e intestino grosso e 15-25% tem colite como manifestação única da doença. Considerando os primeiro e segundo subgrupos, verifica-se envolvimento do íleon terminal em 90%.

Doença rectal e peri-anal: Apesar de a maioria dos doentes não apresentar doença do recto, a doença peri-anal, p.ex. fistulas, fissuras e abscessos está presente em cerca de 1/3 dos doentes, particularmente aqueles com envolvimento do cólon ^[3].

Padrão de envolvimento: É segmentar, verificando-se zonas de doença activa intercaladas com segmentos de intestino delgado absolutamente sãos. Corolário deste facto é a intratabilidade da doença através da ressecção segmentar gastroenterológica.

Histopatologia: Trata-se de um processo transmural em que a inflamação é preponderante. As *lesões primordiais* são ulcerações aftóides superficiais e abscessos de cripta focais com agregados de macrófagos, capazes de formar granulomas não-caseosos transmurais – quer na parede intestinal quer, também, em nódulos linfáticos, no mesentério, peritoneu, fígado e pâncreas. No *decorrer do processo de doença*, ulcerações estreladas sofrem fusão ao longo de planos longitudinais e transversais que originam a demarcação de ilhéus de mucosa saudáveis. É a coexistência – frequentemente, endoscopicamente observável – de áreas de doença activa com estes ilhéus que origina a designação de aparência em pedra-de-calçada.

Apresentação clínica: Doentes com *ileocolite* apresentam uma história de episódios repetidos de dor tipo cólica na FID e diarreia, enquanto doentes com *jejunoileite* podem apresentar condições patológicas secundárias à malabsorção – como sejam anemia, hipoalbuminémia e coagulopatia –, esteatorreia e diarreia. Na *colite e doença peri-anal* existe febre baixa, mal-estar, diarreia, dor abdominal e hematoquécia. Mais raramente, o acometimento *gastroduodenal* origina uma gastrite *Helicobacter pylori*-negativa ou obstrução pilórica. Muito raramente, poderá haver acometimento hepático e/ou pancreático ^[3].

Padrões de evolução: Decorrente do processo inflamatório, particularmente exacerbado na doença activa, pode verificar-se a formação de trajectos fistulosos ou a extensão da doença a outras áreas, por mecanismos não completamente conhecidos e que poderão envolver sinalização parácrina, ou mecanimos iniciadores da inflamação nas novas áreas ^[4,7]. Descrevem-se, também aqui, dois padrões de evolução: ou *fibro-estenossante obstrutivo* ou *penetrante fistuloso*. Poderá existir resolução da inflamação – condicionando fibrose e estenose do lúmen da região entérica correspondente, originando obstrução – ou, em virtude de inflamação serosa e mesentérica, dar-se o desenvolvimento de trajectos fistulosos para o estômago, duodeno, jejuno, íleon, bexiga e vagina – condicionando vómitos fecalóides e má-absorção, a título de exemplo ^[3, 8, 9].

BREVE CARACTERIZAÇÃO DA RCU:

A RCU é uma doença da mucosa que habitualmente envolve o recto e sofre extensão proximal por contiguidade para afectar, em estadios mais avançados, todo o cólon.

Uma caracterização mais completa da RCU recai fora do âmbito da presente tese, pelo que se recomenda a consulta das referências bibliográficas da primeira secção, que fornecem uma perspectiva globalizante acerca da RCU.

II. FUNDAMENTOS DA ETIOPATOGENESE DA DC

I. Etiopatogénese da DC e microbioma

Apesar da dicotomia estabelecida em termos fenotípicos e histopatológicos, uma boa parte dos conhecimentos – actualmente disponíveis – que tentam estabelecer a etiopatogénese da DC tem sido derivada de estudos em doentes com DII – quer com DC quer com RCU.

A TRIÁDE ETIOPATOGENICA:

Em condições fisiológicas verifica-se um estado de homeostasia entre a microbiota comensal, as células epiteliais intestinais (CEI) e as células imunes tecidulares [3, 7].

Alguns autores defendem que estas três grandes valências do hospedeiro se encontram em interacção constante, indelével e consequente – denominando-as de *super-organismo* [10, 11].

Decorrendo de condicionamentos genéticos e estando sujeito a pressões selectivas ambientais, o *microbioma* humano desencadeia uma resposta inflamatória imunologicamente mediada inicial, à qual sucede um *status inflamatório* perpetuado pela desregulação entre estes três componentes da tríade. Assim, a DC é actualmente considerada uma resposta imunitária desadequada à microbiota, eventualmente com um componente de auto-imunidade [12].

O esclarecimento da importância desta interacção é crucial para a compreensão da etiopatogénese, para a previsão da evolução fenotípica e histopatológica da doença e, ainda, para a adopção e investigação de esquemas terapêuticos mais dirigidos, eficazes e condicionadores de menor morbilidade.

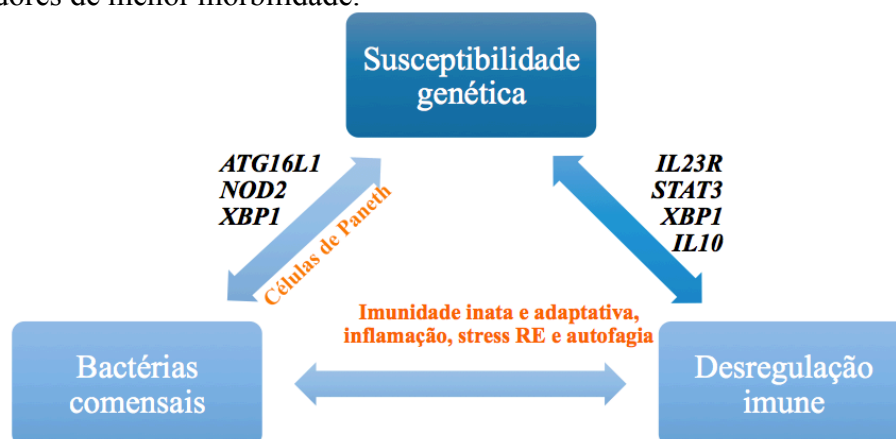


Figura 1 – A tríade etiopatogénica conforme definida no Modelo de Kaser A et al. Adaptado de: Kaser A et al. (2010) *Ann Rev Immunol* 28:573.

A MICROBIOTA E O MICROBIOMA:

Enquanto a expressão *microbiota* é definida como o conjunto de microorganismos presentes no ambiente intestinal, estabelecida segundo análise de sequência génicas de 16S rRNA, sendo os microorganismos classificados segundo a sua taxonomia em bactérias, archae ou *lower* eucariotas – [6, 7], o termo *microbioma* remete-nos para o habitat completo, incluído os

microorganismos, os seus genomas e as condições ambientais circundantes. Este último termo é baseado na definição de *-bioma*, i.e., o conjunto dos factores bióticos e abióticos de um determinado ambiente.

II. Considerações genéticas na DC

Alterações genéticas ao nível de vários *loci* estão bem estabelecidas como estando associadas ao desenvolvimento da DC. O valor das mesmas enquanto factor etiopatogénico deve ser integrado com a evidência epidemiológica disponível e é discutido, abaixo, no texto.

A base genética da DII é sobejamente conhecida da sua ocorrência no contexto de síndromes genéticas – no contexto de mutações genéticas bem definidas – que cursam com DII grave e refractária de início precoce. A título de exemplo, referem-se as síndromes de Turner, Wiskott-Aldrich e de Hermansky-Pudlak e, ainda, as doenças de armazenamento ^[3].

Estudos de associação genómica (GWAS) recentes identificaram 163 *loci* associados à DII. Destes, 100 estão relacionados quer com DC quer com RCU, 30 são específicos para DC e 20 para RCU ^[3].

Especificamente, definem-se 3 categorias major de mutações associadas à DC:

- ✚ **Stress reticular endoplasmático e metabolismo** – mutações relacionadas com a autofagia (*LRRK2*, *IRGM*) e a sensibilidade a antígenos do microbioma (*NOD2*);
- ✚ **Imunidade adaptativa** – mutações relacionadas com a estimulação de células T_H17 (*IL23R*), a produção de citocinas e a interacção com as células T reguladoras (*IL10*, *IL12B* e *PTPN2*);
- ✚ **Inflamação** – mutações relacionadas com a activação macrofágica (*MST1*) e a migração de células dendríticas (*CCR6*).

Modelos animais receptores, ou de moléculas associadas com o reconhecimento de ratinhos *knockout* ou transgénicos em que se procedeu à alteração do padrão de expressão de citocinas específicas (p.ex. IL-2 e IL-10), dos seus de antígenos (TCR), ou ainda interferindo com a função de barreira das CEI (p.ex. a N-caderina ou NF-KB) levam ao desenvolvimento espontâneo de colite ou ileíte, embora seja condição necessária a presença da microbiota comensal ^[13, 14, 15].

Em suma, a DII é considerada uma doença poligénica em que a carga genética é, no mínimo, co-responsável pela definição de vários subgrupos fenotípicos e histopatológicos dentro da DC e da RCU ^[18].

III. Regulação Imune deficiente na DC

Apesar de exposta a conteúdos luminiais dietéticos antigénicos e à microbiota comensal, o sistema imunitário da mucosa é habitualmente não reactivo aos mesmos. Vários mecanismos contribuem para a indução de tolerância imunológica. Entre estes, contam-se a delecção ou anergia de células T reactivas ^[6, 7], bem como a indução de células T CD4+ – células T reguladoras FoxP3+ – que secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-35 e TGF- β . Desta resposta resulta, globalmente, um desequilíbrio na relação citocinas pró-inflamatórias – substâncias anti-inflamatórias, que responsável pela perpetuação da resposta inflamatória.

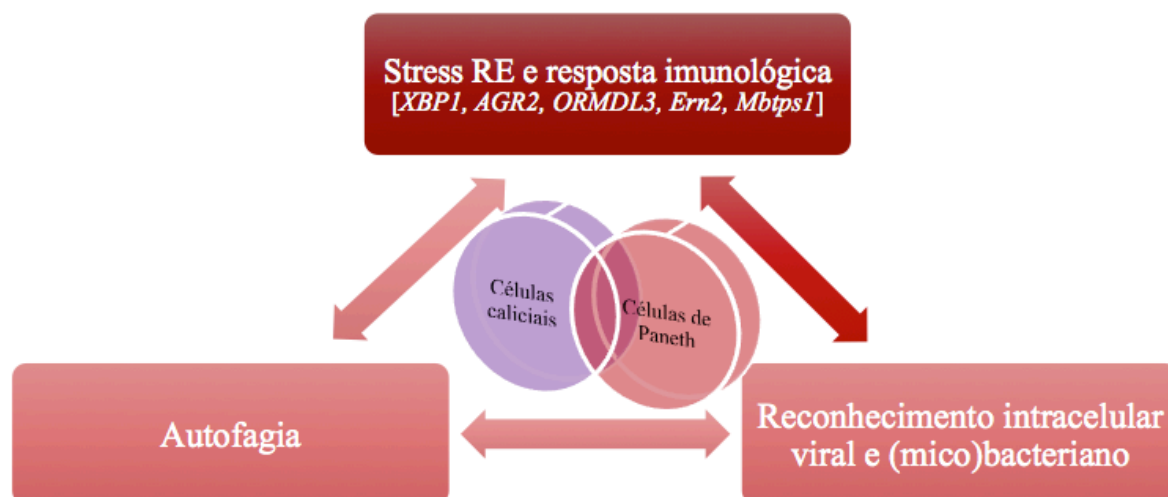


Figura 2 – Conceptualização de três domínios da resposta imunológica deficiente na DII. Adaptado de: Kaser A et al. (2010) *Ann Rev Immunol* 28:573.

Especificamente, são hoje conhecidos 3 tipos de células T CD4+ helper (T_H) associados à resposta inflamatória específica associada à DII em modelos animais.

- ✚ As células T_H1 segregam IFN-gama e são activadas pela IL-12;
- ✚ As células T_H2 segregam IL-4, IL-5 e IL-13 e são activadas pela IL-4 e IL-6;
- ✚ As células T_H17 segregam IL-17 e IL-21 e são activadas pela IL-23 e TGF- β ^[6, 7].

Em suma, destacamos a emergência de uma via inflamatória que decorre de uma predisposição genética – associada a maior reactividade e sensibilidade epitelial e imune aos antígenos ingeridos –, associadamente a vias reguladoras da inflamação deficitárias, conduzindo à activação permanente de células CD4+ ou CD8+. É neste contexto complexo e multifactorial que se enquadra a presença de ASCA enquanto marcador de agente etiopatogénico possível ^[18].

IV. Epidemiologia

As características epidemiológicas da DC apresentam uma variação que se correlaciona com aspectos geográficos, reflectindo a importância de considerar a existência de diferentes estilos de vida e herança genética das diferentes populações na etiogénese [16, 17].

Classicamente, estão definidos dois picos etários associados a maior incidência da DII: dos 15-30 anos e um segundo dos 60-70 anos [19]. A frequência da DII é semelhante em homens e mulheres, verificando-se uma predominância feminina na DC em alguns estudos [20].

Em primeiro lugar, destacamos que existe uma variação étnica, sendo a incidência e a prevalência, em ordem decrescente, maiores em Judeus Ashkenazi, brancos não judeus, afro-americanos, hispânicos e, finalmente, asiáticos. Este facto, associado a uma maior concordância entre gémeos monozigóticos – 38-58% – *versus* a RCU e às mutações genéticas descritas acima no texto, na secção “*Considerações genéticas na DC*”, remetem-nos para a importância de factores genéticos na etiopatogénese da DII [3].

Globalmente, a incidência e a prevalência da DC são máximas em países desenvolvidos e áreas urbanas com desenvolvimento sócio-económico elevado. A incidência apresenta variações regionais, sendo de 0.3-12.7/100.000 pessoas-ano na Europa, 0-20.2/100.000 pessoas-ano na América do Norte e de 0.04-5.0/100.000 pessoas-ano no Médio Oriente e Ásia. Já a prevalência apresenta valores entre os 0.6-322/100.000, 16.7-318.5/100.000 e 0.88-67.9/100.000 na Europa, América do Norte e Médio Oriente / Ásia, respectivamente [3].

Têm-se verificado níveis crescentes de incidência e prevalência em áreas urbanas em processo de urbanização, com destaque para o Japão, China e Coreia, mas também países do Norte de África. Embora não seja possível excluir por completo que estas medidas estatísticas se devam a maiores índices de detecção da doença, tem sido avançado como factor justificador a crescente adopção de hábitos de vida ocidentalizados [16]. A favor disto, temos o maior desenvolvimento de DII entre a população espanhola emigrada na Europa, comparativamente com indivíduos da mesma população emigrados na América Latina. Indivíduos imigrados em países ocidentalizados que retornam ao país de origem têm um risco aumentado de DII [3].

<i>Factores ambientais e associação com a incidência da DC</i>	
<i>Factor ambiental</i>	<i>Risco</i>
Tabaco	OR 1.76
Contraceção oral	OR 1.4
Uso de AB no 1º ano	Aumenta 2.9x o risco de desenvolvimento de DII na infância
Legenda: OR = Odds Ratio.	

Tabela 1 – Factores ambientais e associação com a incidência da DC. Adaptado de Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL *et al.* (2015) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19ed. McGraw-Hill.

A variação geográfica, associada às alterações na incidência da doença documentadas com diferentes estilos de vida em diferentes populações e, ainda, à identificação de vários factores documentais que comprovadamente demonstraram relações de associação com o desenvolvimento da doença – ver Tabela 1 – remetem-nos, secundariamente, para a importância dos factores ambientais na etiopatogénese da doença ^[17].

V. Modelo Integrado de Kaser para o desenvolvimento da DII

Kaser, A. e colaboradores descrevem um modelo globalizante que integra o papel de factores genéticos e ambientais na etiopatogénese da DII ^[13, 18].

Num dos extremos, consideramos a preponderância de factores genéticos e imunológicos como absolutamente determinante para o estabelecimento da etiopatogénese da DC. Este seria o exemplo de uma doença monogénica, de agregação familiar, associada a início precoce.

No outro extremo, encontramos uma causa ambiental como determinante quase exclusiva da etiopatogénese, em que, a existir condicionamento genético, seria poligénico.

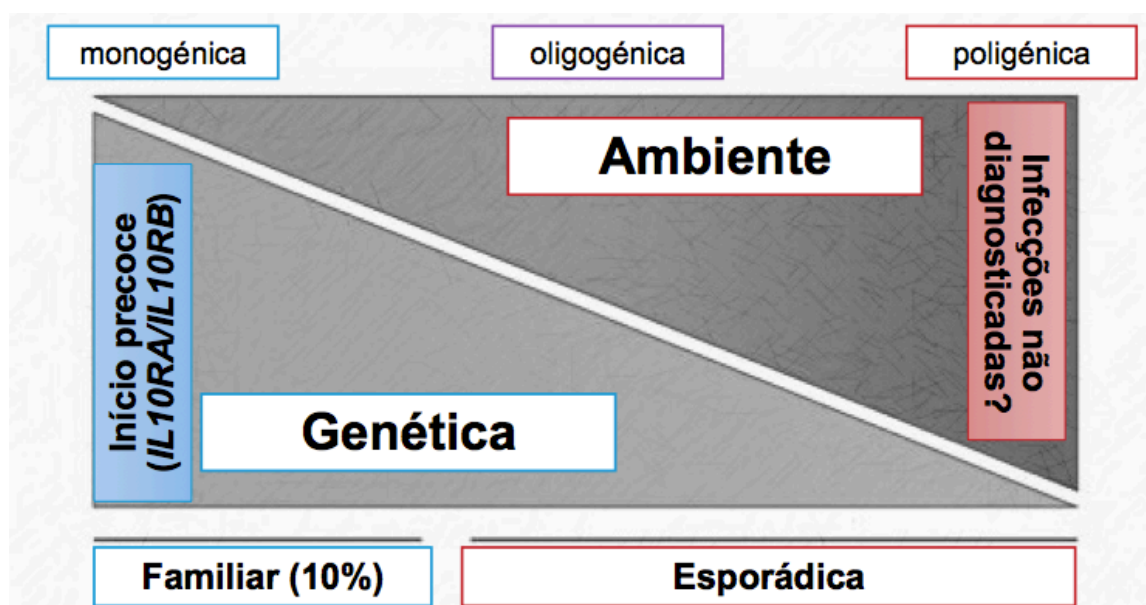


Figura 3 – Modelo integrado de Kaser, A *et al* para o desenvolvimento na DII. Adaptado de: Kaser A et al. (2010) *Digestive Diseases* (Basel, Switzerland), 28(3), 395–405.

Entre um e o outro extremo, encontramos uma conceptualização que entende o desenvolvimento da doença não como algo determinista, mas antes como fruto de uma relação integrada em que se consideram a microbiota, as CEI e o sistema imune do hospedeiro no estabelecimento da DC.

Nos extremos encontramos, portanto, perspectivas conceptualmente ortodoxas que os dados epidemiológicos mais actuais não suportam, enquanto que no meio encontramos uma perspectiva integradora e congruente com as principais correntes de pensamento actuais.

III. Os ASCA na DC – Estado da arte

I. Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*

O microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* é uma forma de vida leveduriforme, com ampla utilização quer na indústria de produção alimentar quer na indústria farmacêutica.

Os ASCA reconhecem uma glicoproteína de 200-kDa presente no SC ^[23].

II. O estudo serológico na DC

A importância dos marcadores serológicos é já sobejamente conhecida, na medida em que, ao proporcionar um conjunto de abordagens não invasivas, torna possível a obtenção de informações com relevo para o diagnóstico, estratificação de risco e acompanhamento da DC.

A par dos avanços verificados na compreensão fisiopatológica da DC, verificaram-se consideráveis desenvolvimentos ao nível dos estudos serológicos na DC. A serologia é habitualmente testada para a presença de pANCA e de ASCA, embora a utilidade dos mesmos no estabelecimento do diagnóstico de RCU ou DC e enquanto factores prognósticos seja limitada, quando comparada com factores clínicos ^[3].

Para diagnosticar a DII e na diferenciação entre DC e RCU, a eficácia do estudo serológico depende da prevalência da doença, e dos marcadores, na população em estudo.

ASCA E pANCA:

Segundo *Friedman S e Blumberg R* ^[3], 5-15% dos parentes em 1º grau de doentes com RCU são pANCA-positivos *versus* 2-3% da população geral. Já 60-70% dos doentes com DC, 10-15% dos doentes com RCU e até 5% dos controlos sem DII são ASCA-positivos.

OUTROS MARCADORES NA DC:

Estão definidos três marcadores serológicos adicionais, especificamente para a DC:

- + **OmpC** (anticorpos para a proteína C da porina de membrana da *Escherichia coli*);
- + **Anticorpos para I₂**, um homólogo de famílias de factores de transcrição bacterianos obtidos a partir de uma sequência de *Pseudomonas fluorescens*;
- + **Anti-CBir1** (anticorpos anti-flagelina). A prevalência dos mesmos na população com DC é de 55%, 50-54% e de 50%, respectivamente ^[3].

III. Novos métodos de detecção de ASCA

Estudos recentes têm advogado que a pesquisa de ASCA no sobrenadante de biópsias obtidas por colonoscopia aumentam a sensibilidade diagnóstica dos mesmos. A aplicação combinada da pesquisa de marcadores – seja pela via serológica seja incluindo a via da biópsia – parece aumentar, também, a sensibilidade diagnóstica para a DC ^[21].

IV. Valor prognóstico

ASCA COMO PREDITORES DA LOCALIZAÇÃO DE DOENÇA:

- + Os ASCA são marcadores de DC proximal. Num estudo de *Walker, LJ e colaboradores* ^[22], 81% dos doentes com atingimento L4 (segundo a Classificação de Viena) e 68% dos doentes L1 ou L3 eram ASCA-positivos. Apenas 38% dos doentes com atingimento do cólon eram ASCA-positivos.
- + Na mesma população, 29% tinha doença peri-anal. Neste subgrupo, existia uma proporção aumentada de doentes ASCA-positivos ($\chi^2 = 3.26$, $P = 0.07$).

ASCA COMO PREDITORES DA IDADE DE INÍCIO DE DOENÇA:

- + No mesmo estudo ^[22], não se verificou uma associação entre a idade de início de doença e a positividade para ASCA. O *cutoff* definido foi de 40 anos. Comparações ulteriores entre idade de início precoce, definida como < 17 anos, e idade de início na vida adulta, i.e., definida dos 17-39 anos, não mostraram resultados estatisticamente significativos. No entanto, estes resultados não são consensuais, conforme explicitado na secção seguinte, no texto.

ASCA COMO MARCADORES DO COMPORTAMENTO DA DOENÇA:

- + **Estenosante / penetrante versus inflamatório:** Segundo os mesmos autores, doentes com doença estenosante (B2) ou penetrante (B3) à apresentação eram mais frequentemente ASCA-positivos do que doentes com doença de comportamento inflamatório (B1) (Kruskal–Wallis, $P = 0.003$).
- + **Conversão de inflamatório para estenosante / penetrante:** Considerando os doentes B1 (n=91) à data do diagnóstico, 40 permaneceram B1 durante o follow-up, enquanto 49 desenvolveram doença B2 ou B3. Os doentes que desenvolveram um padrão de comportamento B2 ou B3 eram mais ASCA-positivos do que os que permaneceram B1 (Kruskal–Wallis, $P < 0.0001$) ^[22].
- + **Estenosante/estenotante versus estenosante/penetrante:** Considerando os doentes B2 (n=12) à data do diagnóstico, 4 permaneceram B2, mas 8 passaram a desenvolver doença penetrante (B3) durante o follow-up. Não se detectaram diferenças estatisticamente significativas entre os que permaneceram B2 e os que se tornaram B3 (Kruskal–Wallis, $P = 0.173$) ^[22].

ASCA COMO MARCADORES DE GENÓTIPO:

- ✚ Ainda relativamente ao mesmo estudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a positividade para ASCA e o número de variantes mais comuns do gene NOD2/CARD15 presentes nem frequência alélica.

IV. ASCA – valor na etiopatogénese em grupos específicos

I. Etiopatogenia

POSITIVIDADE PARA ASCA E A IDADE À DATA DO DIAGNÓSTICO:

Doentes com apresentação da doença na pré-adolescência são mais frequentemente ASCA-positivos (IgG 73%; IgA 50%) do que aqueles com apresentação entre os 13-40 anos de idade (IgG 59%; IgA 39%), e ainda mais do que aqueles com diagnóstico após os 40 anos (IgG 29%; IgA 17%). A evidência disponível explicita, assim, prevalências superiores de positividade para ASCA nas crianças abaixo de 13 anos com DC *versus* população adulta ^[24].

<i>Idade de início de DC estratificada de acordo com a expressão de ANCA e ASCA</i>				
	<13 anos (n=22)	13-40 anos (n=110)	>40 anos (n=24)	valor-p
ASCA +	16 (73%)	65 (59%)	7 (29%)	0.003
IgG e IgA ASCA +	11 (50%)	43 (39%)	4 (17%)	0.02
ANCA +	16 (73%)	16 (73%)	16 (73%)	NS
pANCA +	16 (73%)	16 (73%)	16 (73%)	NS

Apresentam-se, aqui, as designações atribuídas a cada categoria etária:

<13 anos (4-12 anos) = Início na pré-adolescência;

13-40 anos = Início na adolescência e início da vida adulta;

>40 anos = Início tardio na vida adulta. A análise estatística recorreu ao teste do χ^2 .

Tabela 2 – Idade de aparecimento da DC estratificada para a expressão de ASCA. Adaptado de: Vasiliauskas, E *et al.* (2000). *Gut*, 47(4), 487–496 ^[24].

Num estudo de Markowitz J *et al* ^[25], analisaram-se as respostas imunes em crianças com DC; relataram-se diferenças significativas nas prevalências e níveis de ASCA quando considerados dois grupos etários distintos à data do diagnóstico: dos 0-7 anos e dos 8-15 anos. As crianças do primeiro grupo tinham cerca de metade (<20% *versus* 40%, respectivamente, $P<0.001$) da probabilidade de ser ASCA-positivas, em comparação com as do segundo grupo.

Considerando o supracitado, verifica-se uma associação entre a positividade para ASCA e a menor idade à apresentação clínica da DC, associação esta que é perdida quando a apresentação ocorre em menores de 8 anos.

PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS COM DC:

Crianças com DC positivas para as 4 respostas imunológicas mais prevalentes na DC, i.e., ASCA-positivas, OmpC-positivas, I₂-positivas e antiCBir1-positivas, poderão ter um curso mais agressivo e um menor tempo até à progressão para lesão perfurante ou estenosantes ^[3].

II. Um estudo prospectivo em Israel ^[26]

Apesar da escassez de estudos prospectivos, uma equipa de investigadores israelita apresentou, em 2005 ^[26], alguns dados reveladores. No seu estudo, foi investigada a presença de positividade para ASCA e de pANCA no soro antes do aparecimento de manifestações clínicas de DC ou RCU. Por motivos de objectividade, circunscreveremos a nossa análise aos resultados reportados em doentes com DC.

DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO:

O desenho do estudo foi prospectivo e pesquisou ASCA e pANCA em amostras de soro congeladas, obtidas de uma população de homens e mulheres admitidos no serviço militar desde 1980 a 2002. Desde 1980, eram obtidas colheitas de soro de 5% dos recrutas, sendo novas colheitas obtidas aquando da sua saída do serviço militar. Foram analisadas, ulteriormente, as amostras de soro de 32 doentes com DC diagnosticada e as amostras de soro de 8 doentes com RCU diagnosticada.

CONSIDERAÇÕES ACERCA DA POPULAÇÃO ESTUDADA:

Dos 32 doentes com DC diagnosticada, 88% eram do sexo masculino, 47% eram judeus Ashkenazi, 44% eram judeus Sefarditas e 9% eram de origem Israelita.

A idade média à data do diagnóstico era de 24.8 anos. As amostras serológicas mais precoces para cada doente haviam sido obtidas, em média, 59 meses antes do diagnóstico, com um intervalo máximo de 189 meses antes do diagnóstico.

PRINCIPAIS RESULTADOS:

De entre os doentes *com Recto-colite Ulcerosa*:

- ✚ 2 dos 8 dos doentes (25.0%) eram positivos para pANCA antes do diagnóstico de RCU, enquanto que nenhum dos 24 controlos seleccionados (0.0%, $p = 0.014$) era positivo.

De entre os doentes **com Doença de Crohn**:

- + 10 dos 32 dos doentes (31.3%) eram positivos para ASCA antes do diagnóstico de DC, enquanto que nenhum dos 95 controlos seleccionados (0.0%, $p < 0.001$) era positivo;
- + A positividade para ASCA era de 54.5% em doentes após o diagnóstico de DC;
- + O intervalo médio entre a detecção de ASCA e o diagnóstico era de 38 meses;
- + Em 90% dos doentes com DC ASCA-positivos, os anticorpos eram detectáveis já na primeira amostra de soro obtida; consequentemente, o tempo médio entre a detecção de ASCA-positividade no soro e o diagnóstico de DC pode ser mais longo, segundo os autores (*vide* figura 5).

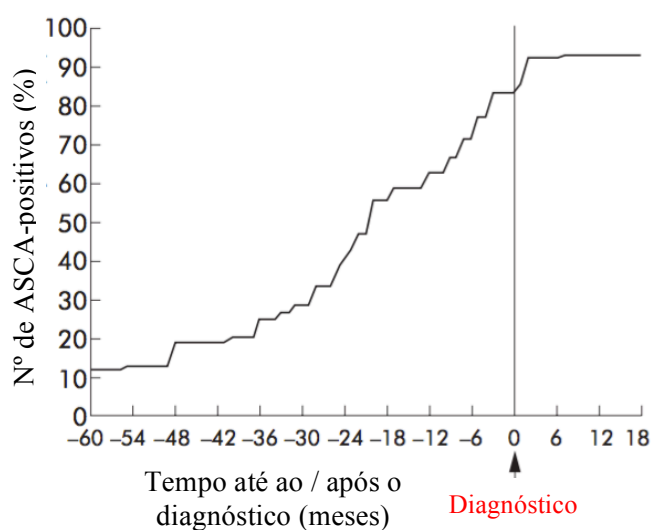


Figura 4 – Curva de Kaplan-Meier para a proporção de doentes ASCA-positivos relativa ao momento do diagnóstico de DC. Adaptado de: Israeli, E et al. (2005). Gut, 54(9), 1232–1236.

BREVE COMENTÁRIO ALICERÇADO NA ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A **figura 4** ilustra a percentagem cumulativa de doentes com serologias positivas para ASCA relativamente ao momento em que foi estabelecido o diagnóstico. De acordo com esta análise, apresentamos alguns dados adicionais:

- + 50% dos doentes eram ASCA-positivos 20 meses antes do diagnóstico;
- + Uma vez que doentes ASCA-positivos logo na primeira amostra poderiam já ter serologias positivas muito antes, recorreu-se a uma curva de Kaplan-Meier para a avaliação da mudança na proporção de doentes com resultados positivos ao longo do tempo.

Adicionalmente, a figura 5 proporciona-nos valiosos dados para uma análise ainda mais interessante. Aqui, já não é apenas apresentada a percentagem de doentes ASCA-positiva, mas antes se explicitam os valores de concentração dos ASCA. São apenas considerados os doentes com DC ASCA-positivos. Assim:

- + Verifica-se um aumento da concentração dos ASCA para tempos progressivamente menores entre a detecção serológica dos mesmos e o estabelecimento do diagnóstico.
- + Estes dados revelam-nos que, neste subgrupo de doentes, as serologias são progressivamente mais positivas à medida que nos aproximamos do momento do diagnóstico clínico. Este facto poderá estar relacionado com um aumento progressivo da resposta inflamatória – condicionando maior permeabilidade intestinal, p.ex. – e da auto-imunidade ainda durante o período subclínico, que culminaria com o surgimento da sintomatologia da doença.

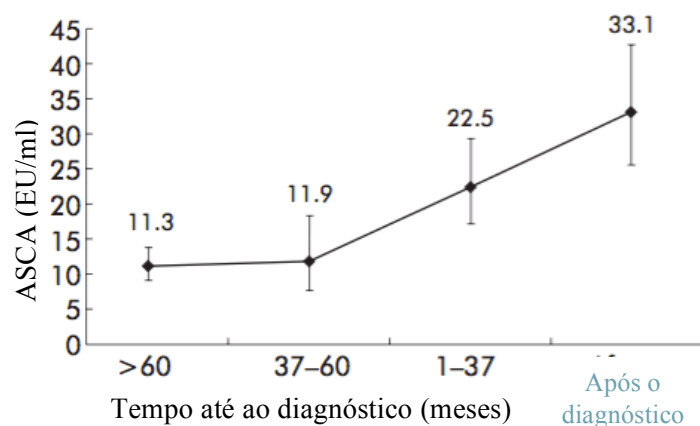


Figura 5 – Concentração de ASCA em doentes com DC em diferentes momentos do tempo. Adaptado de: Israeli, E et al. (2005). Gut, 54(9), 1232–1236.

- + Simultaneamente, verifica-se que após o diagnóstico, as concentrações de ASCA são superiores às verificadas antes do início da doença clínica. Ora, isto poderia remeter-nos para o enquadramento da perpetuação da resposta auto-imune – da qual os ASCA são apenas um dos indicadores – enquanto aspecto participante não só no desenvolvimento, mas na perpetuação da doença neste subgrupo de doentes. No entanto, destacamos que esta é apenas uma ilação possível, já que a relação observada é de associação, não existindo substrato científico para afirmar, com segurança, uma relação de causalidade.

V. Discussão e Integração com o estado do arte

Epidemiologicamente, as variações verificadas na incidência e na prevalência desta doença têm sofrido modificações ao longo do tempo ^[13], o que se poderá associar a uma variação de factores predisponentes / que conferem susceptibilidade à mesma ^[3, 16, 17].

As evidências mais recentes consideram a desregulação da resposta imune como processo fisiopatológico central no desenvolvimento da DII. Neste sentido, surge a importância do estudo do soro para a presença de anticorpos específicos ^[27, 28].

À semelhança de outras doenças em que a auto-imunidade é crucial enquanto responsável fisiopatológica – artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico (LES), e diabetes mellitus tipo 1, p.ex. ^[20], – pensou-se que a serologia verificada na DII poderia prever o desenvolvimento da mesma.

Nas primeiras, é sabido que o aparecimento de anticorpos séricos específicos pode preceder o início da apresentação clínica por muitos anos, o que está particularmente bem estabelecido para o LES, em que se verifica um crescendo de auto-imunidade que culmina na apresentação clínica da doença.

Já na DC, em específico, apesar de se conhecer a associação entre a serologia positiva para ASCA e a presença de doença, ocorre que a maioria da evidência da qual tal tese é derivada se baseia em estudos do tipo caso-controlo. Ora, tal compromete o estabelecimento de uma relação de causalidade permitindo-nos, apenas, concluir uma relação de associação. Em condições ideais, para se provar a causalidade dos ASCA na DC seria necessário recorrer a estudos longitudinais.

Apesar de único, o estudo prospectivo israelita analisado nesta dissertação apresenta-nos razões entendermos o potencial papel dos ASCA como agente relevante numa etiopatogénese que se assume multifactorial para a Doença de Crohn.

Especificamente, teço doravante dois comentários em relação aos resultados do mesmo.

1. Das amostras serológicas obtidas de 32 doentes antes do diagnóstico que foram avaliadas para a positividade para ASCA: 10 dos 32 dos doentes (31.3%) eram positivos para ASCA antes do diagnóstico de DC, enquanto que nenhum dos 95 controlos seleccionados (0.0%, $p < 0.001$) era positivo. Considerando um controlo como ASCA-positivo, o respectivo OR seria de 30.0 (95% CI 4.27-1301.93);
2. Este foi um estudo conduzido numa população classicamente descrita como tendo alto risco, estando focado na pesquisa de uma relação de causalidade entre a positividade



para ASCA e o aparecimento das manifestações clínicas de DC. Não foram tidos em conta outros parâmetros genéticos.

A utilização da serologia enquanto ferramenta diagnóstica e de estratificação de risco / progressão fenotípica careciam, no passado, de uma fundamentação suficiente para justificar a sua adopção na prática clínica.

Hoje, a sua pesquisa permanece merecedora de uma importância modesta quando comparada com a clínica presente no momento do diagnóstico e nos primeiros anos de apresentação da doença.

Não obstante, a evidência demonstra que a sua presença pode ser uma mais-valia como marcador da localização da doença e de prognóstico – considerando a sua sensibilidade e especificidade limitadas – e, eventualmente, influenciar a abordagem terapêutica.

Globalmente, as descobertas analisadas na presente dissertação têm o potencial para a justificação de abordagens inéditas no rastreio a determinados grupos da população, especificamente os subgrupos com alto risco familiar, racial ou combinado para DC. No entanto, permanece a indagação quanto à justificabilidade ética dos rastreios – uma vez que ainda não se pode prevenir a doença.

Entretanto, estudos prospectivos de maior dimensão e robustez metodológica são necessários para que se permita, definitivamente, estabelecer o papel destes anticorpos no desenvolvimento da Doença de Crohn.

VI. Agradecimentos

Agradeço ao Professor Luís Carrilho Ribeiro pelo seu conhecimento, atenção e cuidado. A sua sabedoria e paciência certamente foram impulsionadores magistrais deste trabalho, e servirão de exemplo para toda a minha vida profissional.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional e por, desde sempre, me conceder uma vida abençoada e privilegiada: na educação, na saúde e na companhia. Mas, mais do que tudo, no amor, no brio e na perseverança que em mim gravaram.

Agradeço, finalmente, aos meus amigos, cuja companheirismo e presença foram, e sempre serão, fonte de refúgio nos momentos mais desafiantes e uma inspiração determinante para a minha responsabilidade.

VII. Referências bibliográficas

- ✚ 1. Huppertz-Hauss, G., Høivik, M. L., Langholz, E., Odes, S., Småstuen, M., Stockbrugger, R., Bernklev, T. (2015). Health-related Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease in a European-wide Population-based Cohort 10 Years After Diagnosis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 337–344.
- ✚ 2. Häuser, W., Moser, G., Klose, P., & Mikocka-Walus, A. (2014). Psychosocial issues in evidence-based guidelines on inflammatory bowel diseases: A review. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(13), 3663–3671. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3663>.
- ✚ 3. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL & Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine – 19rd ed.* McGraw-Hill Medical, 2015. ISBN-13: 978-0071802154.
- ✚ 4. Anand BS (Ed.) (2015). Inflammatory Bowel Disease. *Medscape*.
Acedido a 30 de abril <http://emedicine.medscape.com/article/179037-overview>.
- ✚ 5. Whiteside, SA, Razvi H, Dave S, Reid G & Burton JP (2015). The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nature Reviews Urology* 12, 81–90 (2015) doi:10.1038/nrrol.2014.361.
- ✚ 6. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the Human Microbiome. *Nutrition Reviews*, 70 (Suppl 1), S38–S44. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493>.
- ✚ 7. Caldwell, A. B., Cheng, Z., Vargas, J. D., Birnbaum, H. A., & Hoffmann, A. (2014). Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF. *Genes & Development*, 28(19), 2120–2133. <http://doi.org/10.1101/gad.244749.114>.
- ✚ 8. World Gastroenterology Organisation (WGO). *World Gastroenterology Organisation Global Guideline. Inflammatory bowel disease: a global perspective*. Munich, Germany: World Gastroenterology Organisation (WGO); 2009.
- ✚ 9. Lashner B. Inflammatory bowel disease. Carey WD, ed. *Cleveland Clinic: Current Clinical Medicine -- 2009*. Philadelphia, Pa: Saunders; 2009.
- ✚ 10. Hsieh, M. H., & Versalovic, J. (2008). THE HUMAN MICROBIOME AND PROBIOTICS: IMPLICATIONS FOR PEDIATRICS. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 38(10), 309–327. <http://doi.org/10.1016/j.cppeds.2008.09.001>.
- ✚ 11. Lewis, JD *et al.* (2015) *Inflammation, Antibiotics and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease*. *Cell Host & Microbe*, Volume 18, Issue 4, 489-500.
- ✚ 12. Øyri SF, Mu'zes G, Sipos F. (2015) *Dysbiotic gut microbiome: A key element of Crohn's disease*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 43 (2015) 36–49.
- ✚ 13. Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*, 28, 573–621. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>.
- ✚ 14. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., ... Cho, J. H. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), 119–124. <http://doi.org/10.1038/nature11582>.
- ✚ 15. Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307–317. <http://doi.org/10.1038/nature10209>.

- ✚ 16. Molodecky NA, Shoon IS et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.
- ✚ 17. Kappelman, M. D., Moore, K. R., Allen, J. K., & Cook, S. F. (2013). Recent Trends in the Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in a Commercially Insured US Population. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(2), 519–525. <http://doi.org/10.1007/s10620-012-2371-5>.
- ✚ 18. Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(3), 395–405. <http://doi.org/10.1159/000320393>.
- ✚ 19. Kornbluth A, Sachar DB, Salomon P. Crohn's disease. Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. 6th. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1998. Vol 2: 1708-34.
- ✚ 20. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1984 Oct. 29(10):913-20.
- ✚ 21. Bertin, D., Grimaud, J.-C., Lesavre, N., Benelmouloud, C., Desjeux, A., Garcia, S., & Desplat-Jégo, S. (2013). Targeting Tissue Immune Response Improves Diagnostic Performance of Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies (ASCA) in Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 8(11), e80433. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080433>.
- ✚ 22. WALKER, L. J., ALDHOUS, M. C., DRUMMOND, H. E., SMITH, B. R. K., NIMMO, E. R., ARNOTT, I. D. R., & SATSANGI, J. (2004). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(3), 490–496. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02392>.
- ✚ 23. Buckland, M. S., Mylonaki, M., Rampton, D., & Longhurst, H. J. (2005). Serological Markers (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Mannan Antibodies and Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies) in Inflammatory Bowel Disease: Diagnostic Utility and Phenotypic Correlation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(11), 1328–1330. <http://doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1328-1330.2005>.
- ✚ 24. Vasilias, E., Kam, L., Karp, L., Gaiennie, J., Yang, H., & Targan, S. (2000). Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut*, 47(4), 487–496. <http://doi.org/10.1136/gut.47.4.487>.
- ✚ 25. Markowitz, J., Kugathasan, S., Dubinsky, M., Mei, L., Crandall, W., LeLeiko, N., ... Hyams, J. (2009). Age of Diagnosis Influences Serologic Responses in Children with Crohn Disease: A Possible Clue to Etiology? *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(5), 714–719. <http://doi.org/10.1002/ibd.20831>.
- ✚ 26. Israeli, E., Grotto, I., Gilburd, B., Balicer, R. D., Goldin, E., Wiik, A., & Shoenfeld, Y. (2005). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*, 54(9), 1232–1236. <http://doi.org/10.1136/gut.2004.060228>.
- ✚ 27. Annu Rev Immunol. 2010;28:573-621. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101225. Inflammatory bowel disease. Kaser A(1), Zeissig S, Blumberg RS.
- ✚ 28. Tabrah, F. L. (2011). Koch's Postulates, Carnivorous Cows, and Tuberculosis Today. *Hawaii Medical Journal*, 70(7), 144–148.
- ✚ 29. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004;363:1544–6.
- ✚ 30. Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., & Colombel, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749–753. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>.

VIII. Apêndice

Classificações de Viena e de Montreal para a Doença de Crohn ^[30]

	Vienna	Montreal
Idade do diagnóstico	A1 below 40 y A2 above 40 y	A1 below 16 y A2 between 17 and 40 y A3 above 40 y
Localização	L1 ileal L2 cólica L3 ileocólica L4 tracto gastrointestinal superior	L1 ileal L2 cólica L3 ileocólica L4 tracto gastrointestinal superior (isoladamente) *
Comportamento	B1 não estenosante, não penetrante B2 estenosante B3 penetrante	B1 não estenosante, não penetrante B2 estenosante B3 penetrante p †

*L4 é um modificador que pode ser adicionado a L1–L3 quando se verifica doença to tracto gastrointestinal superior concomitante. †“p” é adicionado aos estadios B1–B3 quando se verifica a co-existência de doença peri-anal.

Tabela 3 – Classificações de Viena e de Montreal para a Doença de Crohn. Adaptado de: Satsangi, *J et al* (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749–753.